

PHOTOTAXIS BEI VOLVOX PIGMENTSYSYSTEME DER LICHTRICHTUNGSPERZEPTION

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Karl Schletz
aus Hohenberg

PHOTOTAXIS BEI VOLVOX PIGMENTSYSYSTEME DER LICHTRICHTUNGSPERZEPTION

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt von
Karl Schletz
aus Hohenberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung:

14. 5. 1975

Vorsitzender der kommissarischen

Promotionskommission:

Prof. Dr. H. Behrens

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. W. Haupt

Zweitberichterstatter:

Doz. Dr. K. Seitz



PHOTOTAXIS BEI VOLVOX

PIGMENTSYSTEME DER LICHTRICHTUNGSPERZEPTION

Inhalt

I. Einleitung	1
II. Allgemeine Methoden	3
III. Experimenteller Teil	7
1. Aktionsspektrum des Beschattungspigmentsystems	7
2. Mikrospektrophotometrische Untersuchung in vivo der für die Beschattung in Frage kommenden Strukturen	17
3. Aktionsspektrum der phobischen Reaktion (Photorezeptor)	22
4. Spektrale Abhängigkeit der Schwellenwerte - Aktionsspektrum der positiven Phototopotaxis	27
5. Pigmentanalyse	33
IV. Diskussion	38
V. Zusammenfassung	44
VI. Literaturverzeichnis	46

1. Einleitung

Die phototaktische Orientierung rotierender Flagellaten erfolgt nach Ansicht der meisten Autoren nach dem Prinzip der periodischen Beschattung (z.B. HAUPT 1959 und 1966, FEINLEIB und CURRY 1971a). Versuche von BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN (1956) und GÖSSEL (1957) mit Euglena führten zu der Folgerung, daß der Photorezeptor nicht durch das Stigma repräsentiert wird, sondern durch den paraflagellaren Körper, und daß die photophobische Reaktion ausschließlich auf Wirkungen des Photorezeptors zurückzuführen ist, während die positive Phototopotaxis der Mitwirkung des Stigmas bedarf.

Es muß also die Existenz zweier getrennter Pigmentsysteme (für die eigentliche Perzeption und für die Erzeugung von periodischen Intensitätsänderungen) postuliert werden, durch deren sinnvolles Zusammenwirken es zu einer phototopotaktischen Orientierung kommt.

Dabei bleiben jedoch weiterhin vor allem die Frage nach Natur und Funktion des Beschattungssystems und die Art seiner funktionellen Integration in den phototaktischen Orientierungsprozess offen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es deshalb, durch geeignete Methoden der Aktions- und Absorptionsspektrophotometrie die an der Orientierung beteiligten Pigmentsysteme differenzierend darzustellen und damit weitere Aufschlüsse über ihre optischen und funktionellen Eigenschaften und ihre Lagebeziehung zu erhalten.

Als Objekt scheint hierfür besonders Volvox geeignet, dessen Bewegungs- und Orientierungsmechanismus eingehend untersucht ist (HUTH 1970a,b). Außerdem besitzt die Kolonie eine klare Architektur und ist durch ihre Größe, Schwimgeschwindigkeit und Rotationsfrequenz einer direkten mikroskopischen Beobachtung leicht zugänglich. Dadurch können alle Details des Reaktionsverhaltens durch Einzelbeobachtung gewonnen werden, weshalb dieses Verfahren gegenüber der gegenwärtig bevorzugten Populationsmethode gewisse Vorzüge aufweist.

II. Allgemeine Methoden

Material und Kultur

Die Versuche wurden mit einem Klon von *Volvox aureus*, Stamm L 88-1 aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen durchgeführt. Als Gefäße für die Stammkulturen dienten Fernbachkolben von ca. 200 ml Volumen.

Die Temperatur im Konstantraum betrug +16°C; Leuchtstoffröhren (Radium NL 40W/15 und Osram L 40W/32), die im Licht-Dunkel - Wechsel von 12:12 Stunden betrieben wurden, lieferten eine Intensität von 1500 bis 2000 Lux an den Kulturen. Das unmittelbar für die Versuche benötigte Material wurde in einem Lichtthermostaten (+18°C; Osram L 20W/64, Radium NL 20W/32, Tungsram 20W F-7 Daylight; 1600 Lux; Licht - Dunkel - Wechsel 12:12 Stunden) in Reagensgläsern aufbewahrt.

Nach Versuchen, den pH-Wert durch ein geeignetes $\left[\text{NO}_3^-\right]/\left[\text{NH}_4^+\right]$ - Verhältnis zu stabilisieren (SCHLETZ 1974), wurde folgendes Kulturmedium verwendet, dessen pH-Wert mehrere Wochen um 7,6 verbleibt (Angaben für jeweils 1000 ml Nährlösung):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,073 mmol
K_2HPO_4	0,103 mmol
NH_4NO_3	1,12 mmol
Malonsäurediamid	0,5 mmol
Spurenelementlösung*	2 ml
Erddekot	10 ml

* nach PRINGSHEIM (1963), S. 140

Alle 30 Tage wurde das Substrat gewechselt, indem die alten Kulturen durch ein Nylonnetz (Maschenweite 80 μm) gesiebt, mehrmals darauf gewaschen und anschließend in frisches Nährmedium übertragen wurden.

Versuche zur Phototaxis

Als Lichtquelle diente ein in einen beweglichen Kasten eingebauter Diaprojektor Prado Universal (Leitz) mit einer 250W-Halogenlampe, die über einen Fußschalter zu bedienen war. Das Projektorgehäuse war mit einem verschiebbaren Filtermagazin versehen und auf Rollen gelagert. Monochromatisches Licht wurde durch Interferenzfilter (AL und DAL) und Farbgläser erzeugt, die Lichtintensität durch Neutralgraufilter oder Verschieben des Projektorgehäuses reguliert.

Beobachtet wurde mit einem Mikroskop SM-Lux (Leitz) mit Zeichenansatz und Dunkelfeldeinrichtung. Das Objektiv Pl 1/0,04 mit dazugehörendem Kondensor ermöglichte einen Gesichtsfeld-durchmesser von 15,5 mm. Phototaktisch unwirksames Beobachtungslicht lieferte die Mikroskopbeleuchtung mit zwischengeschalteten Interferenzfilter AL 681 (Intensität in Objekthöhe: 1900 mW/m^2).

Als Versuchsgefäße dienten Plexiglasküvetten aus 1 mm starkem Material mit den Innenmaßen 55x32x10 (bzw. 4) mm. Die Küvet-tenseitenteile waren auf eine Grundplatte (76x36x3 mm) geklebt und alle Flächen außer der Grundplatte im Küvettenbereich und der der Lichtquelle zugewandten Seite mit schwarzem Optiklack bestrichen.

Die Lichtrichtung wurde mit einem Schlitzblendensystem, modifiziert nach HUTH (1970a), bestimmt, die Intensität des Reiz-

lichtes mit einer Thermosäule bzw. einem Spectra Pritchard Photometer Model 1980 mit FAI-160-cos-Vorsatz gemessen.

(Eichung mit Spectra Regulated Brightness Source BSR-100 B).

Um bei den Intensitätsmessungen die gleichen Verhältnisse wie innerhalb der Versuchsküvette zu simulieren, wurde in den Strahlengang jeweils eine Plexiglasscheibe mit den Eigenschaften des Küvettenmaterials eingebaut. Dies erwies sich vor allem für Messungen unterhalb 400 nm als notwendig, da in diesem Spektralbereich bereits erhebliche Anteile der Strahlung absorbiert werden (bei 370 nm etwa 80%).

Mikrospektrophotometrie

Die lebenden Kolonien wurden zwischen einem Objektträger und einem Deckglas mit Füßchen aus Paraffin-Gelatine stillgelegt. Die Messungen erfolgten mit einem Mikroskop - Photometer MPV 2 (Leitz) mit Mikroskop Orthoplan und Computer zur Steuerung des Dispersionsgitters, Speicherung und Auswertung der Meßwerte und Ausdrucken der Spektren über einen Schreiber. Gemessen wurde im Bereich 380 bis 600 nm mit Intervallen von 5 nm; der Durchmesser des Blendenbildes in der Objektebene betrug 1 µm. Die Absorption der Koloniegeallerte wurde mit einem Mikroskop-Photometer MPM (Zeiss) mit Standard Universal - Mikroskop gemessen.

Pigmentanalyse

Das Material wurde in einem 6-Liter-Rundkolben bei einer täglichen Begasung von 2 - 3 Stunden herangezogen. Das Gesamtvolumen der 38 Tage alten Kultur betrug 5,5 Liter, was

einem Trockengewicht von 434,5 mg entsprach. Da Volvox sich kaum zentrifugieren läßt, mußte die Kultur über ein Papierfilter abgesaugt werden. Darauf erfolgte Acetonextraktion (80%), Überführung in Äther, Verseifung mit 1,5% methanolischer KOH und dünnschichtchromatographische Auftrennung der Carotinoidfraktion (DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 schnelllaufend; Laufmittel: Benzol/Aceton 3:1).

Nach Extraktion der aufgetrennten Banden (Carotine mit Leichtpetroleum, die übrigen mit Äthanol) wurde durch Messung der Extinktionen der Anteil der einzelnen Pigmente bestimmt.

III. Experimenteller Teil

1. Aktionsspektrum des Beschattungspigmentsystems

Bei der Fortbewegung ohne Orientierungslicht beschreibt Volvox einen nach links gekrümmten Kreisbogen. Das Phänomen der Richtungsabweichung wurde schon von MAST (1917) beschrieben und von HUTH (1970b) genauer untersucht. Danach wird die Linksabweichung rein physikalisch durch die Kolonierotation verursacht. Im Orientierungslicht dagegen entsteht eine gerade Schwimmbahn als Resultante zwischen der physikalisch bedingten Linksabweichung und der phototaktischen Orientierung. Diese Gerade bildet mit der Lichtrichtung einen bestimmten Winkel, dessen Größe von dem Quotienten "zurückgelegte Wegstrecke pro Rotation" abhängig ist (HUTH 1970b).

Die Tatsache, daß die Kolonien sich bei phototaktischer Orientierung auf geraden Bahnen bewegen, spricht dafür, daß dieser Quotient bei konstanten Bedingungen für die Einzelkolonie als Konstante angesehen werden kann, da es sonst zu spontanen Änderungen des Abweichwinkels kommen müßte. Unterschiede in der Größe der Linksabweichung bei verschiedenen Kolonien werden so aufgefaßt, daß oben genannter Quotient von Kolonie zu Kolonie verschieden sein kann und offenbar vom jeweiligen Zustand der Einzelkolonien, der Populationen, des Nähr- und Untersuchungsmediums und den allgemeinen Untersuchungsbedingungen abhängt.

Untersuchungen von HUTH (1970a) bestätigen die Auffassung,

daß die phototaktische Orientierung bei Volvox nach einem Ruderbootmechanismus durch periodische Beschattung zustande kommt.

Dabei treten im Rhythmus der Kolonierotation an den Einzelzellen phobische Reaktionen (Sperrstellung der Geißeln) durch sprunghafte Intensitätserhöhung an der der Lichtquelle zugewandten Kolonieseite auf. Da gleichzeitig die Geißeln auf der "Schattenseite" weiterschlagen, schwenkt die Kolonie mit ihrer Längsachse in die Lichtrichtung ein.

Zwischen der Größe der Intensitätssprünge und der Stärke der phobischen Reaktion besteht ein direkter Zusammenhang (HUTH 1970a). Die Intensitätsänderungen werden durch ein Beschattungssystem hervorgerufen, das die Intensität des Reizlichtes am eigentlichen Photorezeptor einer periodischen Modulation unterwirft. Bei Funktionieren des Ruderbootprinzips und unter der Voraussetzung, daß die Linksabweichung von der Lichtintensität unabhängig ist, sollte sich deshalb bei phototaktischer Orientierung in monochromatischem Licht bei Wellenlängenwechsel eine Veränderung des Abweichwinkels ergeben, die nur von den Absorptionseigenschaften des Beschattungssystems abhängig ist.

Vollzieht sich der Wechsel auf eine Wellenlänge, die vom Beschattungssystem stärker absorbiert wird, so sollte sich der Abweichwinkel verkleinern, da in diesem Fall die Intensität an den Photorezeptoren auf der Schattenseite absinkt, während sie auf der Lichtseite konstant bleibt. Es kommt also zu größeren Intensitätssprüngen an den Photorezeptoren, so daß der Ruderboot - Effekt verstärkt wird. Umgekehrte Verhältnisse

sollten sich in einem Spektralbereich ergeben, in dem die Absorption des Beschattungssystems abnimmt; an der Stelle maximaler Absorption sind minimale Abweichwinkel zu erwarten.

Da im folgenden mit gleichen Intensitäten gearbeitet wurde, unter diesen Umständen die "physiologischen Intensitäten" am Photorezeptor jedoch verschieden sind, wurde zunächst geprüft, ob in monochromatischem Licht eine Abhängigkeit des Abweichwinkels von der Lichtintensität besteht. Wie Abb. 1 zeigt, ist dies nicht der Fall, so daß die entsprechenden Ergebnisse von HUTH (1970b) mit Weißlicht bestätigt werden.

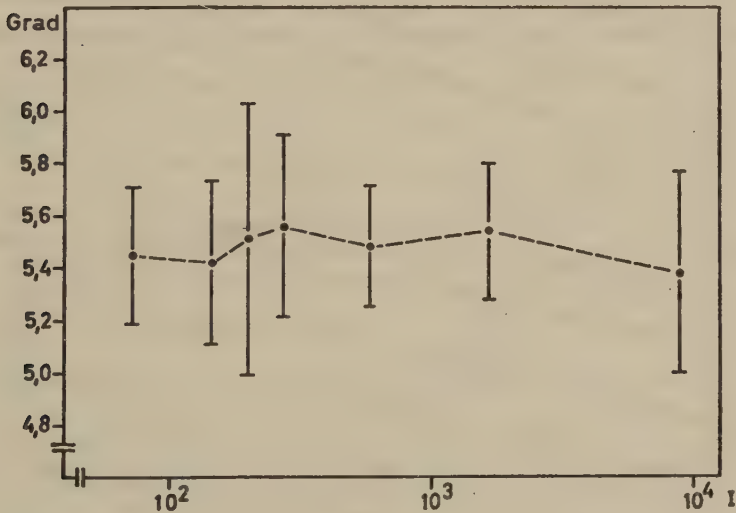


Abb. 1: Einfluß der Lichtintensität (I) auf die Größe des Abweichwinkels für $\lambda = 449 \text{ nm}$. Senkrechte Strecken: Standardfehler der Mittelwerte. Intensität in mW/m^2 .

Die Schwimmbahnen der einzelnen Kolonien wurden über einen Zeichenansatz auf Millimeterpapier übertragen, dessen Querliniatur mit der Lichtrichtung zur Deckung gebracht worden war, so daß mit einem Winkelmesser die Größe der Abweichwinkel bestimmt werden konnte. Die Intensität des Reizlichtes betrug 470 mW/m^2 ($\pm 5\%$); etwa 2000 Bahnen wurden ausgewertet.

Die Abhängigkeit des Abweichwinkels von der spektralen Eigenschaft des Reizlichtes wird direkt sichtbar, wenn positiv phototaktisch reagierende Kolonien einem Wellenlängenwechsel

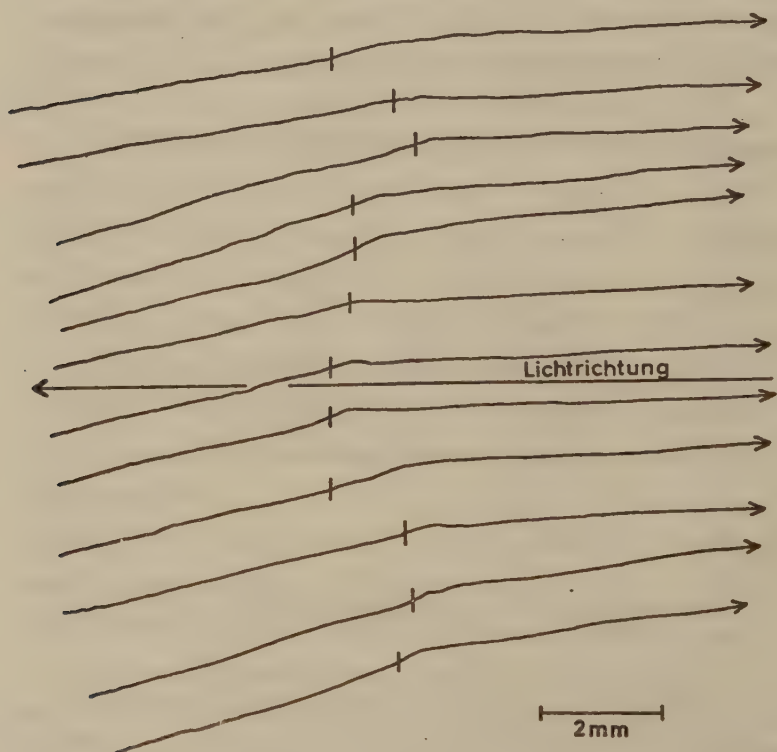


Abb. 2: Schwimmbahnen von *Volvox aureus* während phototaktischer Orientierung. Wellenlängenwechsel (senkrechte Markierungen) von 482 nm auf 434 nm bei konstanter Intensität ($I = 474 \text{ mW/m}^2$).

unterworfen werden. In diesem Fall tritt ein Knick in der Schwimmbahn auf, dessen Richtung und Stärke von der relativen Wirksamkeit der verwendeten Wellenlängen abhängt (Abb.2).

Bei Änderung der Wellenlänge können phobische Reaktionen auftreten, die jedoch in keinem direkten Zusammenhang zur Änderung der Schwimmrichtung stehen: Eine Vergrößerung bzw. Verkleinerung des Winkels kann sowohl mit als auch ohne vorhergehende phobische Reaktion eintreten; alle Kombinationen sind möglich - ein erster Hinweis darauf, daß das Wirkungsmaximum der phobischen Reaktion in einem anderen Spektralbereich zu suchen ist.

Eine Erscheinung, die schon von HUTH (1970a) bei Änderung der Bewegungsrichtung beobachtet wurde, trat auch hier auf: Nach

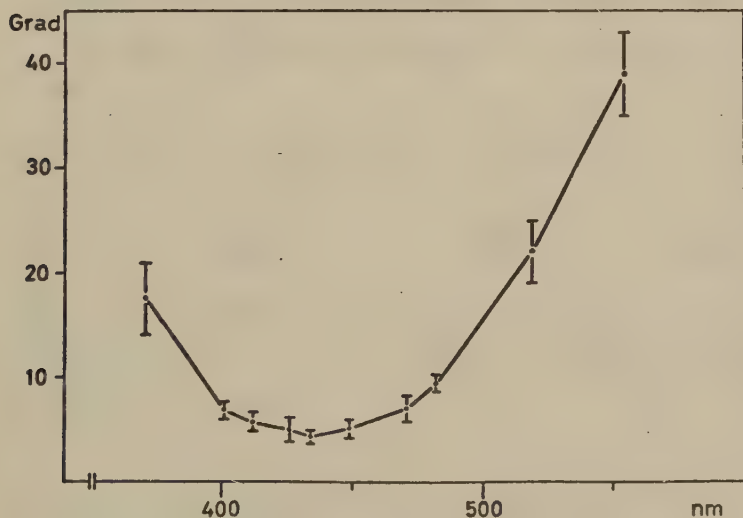


Abb. 3: Abhängigkeit der Abweichwinkel (Linksabweichung) von der Wellenlänge. $I = 470 \text{ mW/m}^2 \pm 5\%$. Senkrechte Strecken: 3-fache Standardfehler der Mittelwerte.

einem Wechsel der Wellenlänge setzen die Kolonien ihren Weg jeweils ein kurzes Stück in der ursprünglichen Bewegungsrichtung fort, um dann in die neue Richtung einzuschwenken. Ist dies nicht der Fall, so geht der Richtungsänderung zumindest ein Rotieren auf der Stelle voraus - ein Befund, der das Ergebnis von HUTH, nach dem die Perzeption der Lichtrichtung nur während der Bewegung möglich ist, ergänzt.

Die Mittelwerte der für die verwendeten Wellenlängen gemessenen Abweichwinkel wurden bestimmt. Sie zeigen ein Minimum bei 434 nm und vergrößern sich gleichmäßig in den violetten und grünen Spektralbereich hinein (Abb. 3). In Grünlicht beträgt der Winkel zwischen Lichtrichtung und Translationsrichtung bereits bis zu etwa 40 Grad.

Die Maxima der Häufigkeitsverteilungskurven der Abweichwinkel für die einzelnen Wellenlängen stimmen meist gut mit

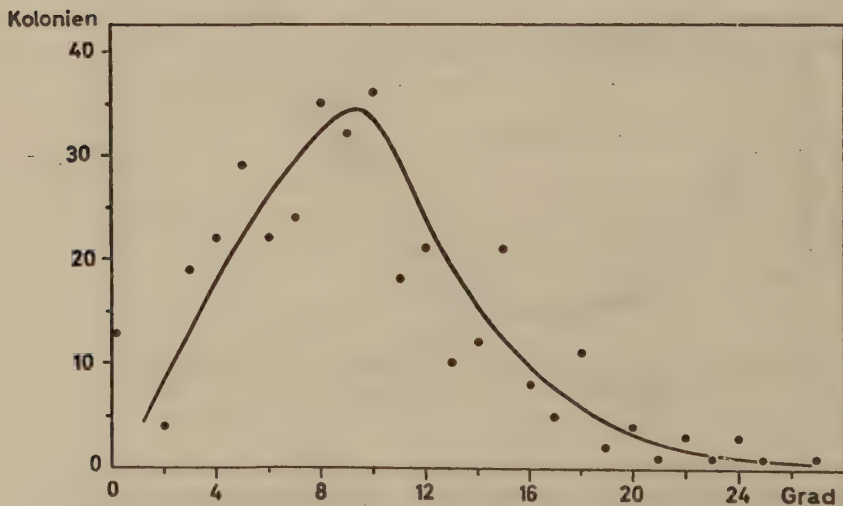


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Abweichwinkel gegenüber der Lichtrichtung für $\lambda = 482\text{nm}$. $I = 474\text{ mW/m}^2$.

deren Mittelwerten überein (Abb. 4). Allerdings ist die Streuung oft erheblich.

Durch Auftragen der 100-fachen Kehrwerte der mittleren Abweichwinkel gegen die Wellenlänge ergibt sich das Aktionspektrum des Beschattungssystems (Abb. 5). Es besitzt ein Maximum im Bereich 420 - 450 nm; die Flanken fallen, ohne eine besondere Feinstruktur aufzuweisen, in den violetten und grünen Spektralbereich gleichmäßig ab.

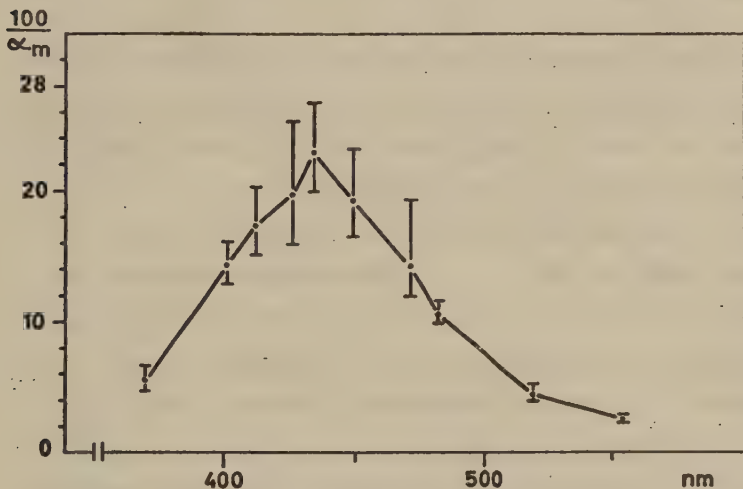


Abb. 5: Aktionsspektrum des Beschattungspigmentsystems. Ordinate: 100-fache Kehrwerte der mittleren Abweichwinkel. Senkrechte Strecken: Reziproke Werte der dreifachen Standardfehler der Mittelwerte.

Auf Grund der großen Fehlergrenzen im Maximumsbereich erscheint rein statistisch eine genauere Lokalisierung des Maximums zunächst problematisch. Ein direkter Vergleich der Wirkung benachbarter Wellenlängen an Einzelkolonien während

phototaktischer Orientierung zeigt jedoch, daß die relative Lage der Punkte richtig ist: Ein Wellenlängenwechsel in Richtung auf das Maximum (434 nm) ergibt immer eine Verkleinerung (vergl. Abb. 2), ein Wechsel in entgegengesetzter Richtung eine Vergrößerung des Abweichwinkels, was sich unmittelbar in einem entsprechenden Knick in der Schwimmbahn äußert. Das Wirkungsmaximum des Beschattungssystems liegt also bei 434 nm, d.h. diese Wellenlänge ist wirksamer als 426 und 449 nm.

Da die Größe des Abweichwinkels auch eine Funktion des Quotienten "Weg pro Umdrehung" ist (HUTH 1970b), mußte geprüft werden, ob dieser Quotient etwa im Sinne eines photokinetischen Effektes von der Wellenlänge abhängig ist. Würde sich nämlich beim Übergang auf eine Wellenlänge, die näher am Maximum liegt (s. Abb. 5), die Schwimmgeschwindigkeit erhöhen, die Rotationsfrequenz dagegen gleichbleiben, so hätte dies eine Verkleinerung des Abweichwinkels zur Folge, da das Verhältnis "Weg pro Umdrehung" sich vergrößern würde. Es war deshalb notwendig, die Abhängigkeit der Parameter Weg/Umdrehung, Rotationsfrequenz und Translationsgeschwindigkeit von der Wellenlänge zu untersuchen, und zwar unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei der Erstellung des Aktionsspektrums des Beschattungssystems.

Mit einem Okular - Kreuzlinienraster wurde die Versuchsstrecke von 10,3 mm festgelegt. Durch Drehung des Okularrasters konnte die Richtung der Rasterlinien der jeweiligen Schwimmrichtung der beobachteten Kolonie angepaßt werden. Die Schwimmdauer von der Start- bis zur Ziellinie wurde mit einer Stoppuhr gemessen, während gleichzeitig die Umdrehungen gezählt

wurden. Auf diese Weise konnten für jede einzelne Kolonie zugleich Translationsgeschwindigkeit, Rotationsfrequenz und Weg/Umdrehung bestimmt werden. Die Lichtintensität betrug 500 mW/m^2 ; 100 Kolonien pro Wellenlänge wurden ausgewertet.

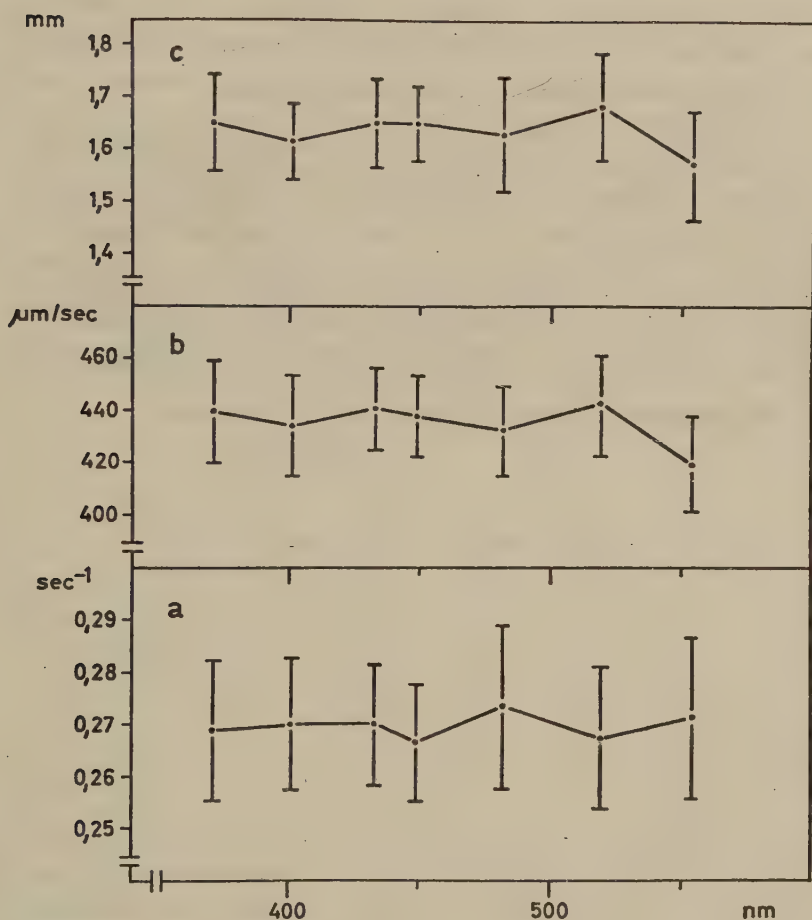


Abb. 6: Abhängigkeit von Rotationsfrequenz (a), Translationsgeschwindigkeit (b) und Weg/Umdrehung von der Wellenlänge. $I = 500 \text{ mW/m}^2$. Senkrechte Strecken: 3-fache Standardfehler der Mittelwerte.

Die mittlere Rotationsfrequenz beträgt 0,27 Umdrehungen pro Sekunde; für eine Umdrehung werden im Schnitt 3,7 Sekunden benötigt. Für die Translation ergibt sich eine mittlere Geschwindigkeit von 0,44 mm/sec, pro Umdrehung wird eine mittlere Wegstrecke von 1,63 mm zurückgelegt. Die Werte für Translation und Rotation stimmen in der Größenordnung mit den von GERISCH (1959) angegebenen überein.

In keinem Fall konnten innerhalb der gefundenen Kurven signifikante Unterschiede der Mittelwerte festgestellt werden; die drei genannten Parameter bleiben also bei der verwendeten Intensität im untersuchten Spektralbereich konstant (Abb. 6 a, b, c), so daß die Beteiligung eines photokinetischen Effektes bei der Erstellung des Aktionsspektrums des Beschattungssystems ausgeschlossen werden kann.

2. Mikrospektrophotometrische Untersuchung in vivo der für die Beschattung in Frage kommenden Strukturen

Stigma

Wenn das Aktionsspektrum des Beschattungssystems auf Absorptionseigenschaften des Stigmas zurückzuführen ist, so sollte dessen Absorptionsmaximum im gleichen Spektralbereich wie das Wirkungsmaximum liegen. Mit einem Mikrospektrophotometer wurden deshalb an lebenden Kolonien Absorptionsspektren des Stigmas aufgenommen. Wie Abb. 7 zeigt, weist das Spektrum eine typische Carotinoidstruktur auf, wenn auch die Nebengipfel weniger deutlich ausgeprägt sind als bei einer

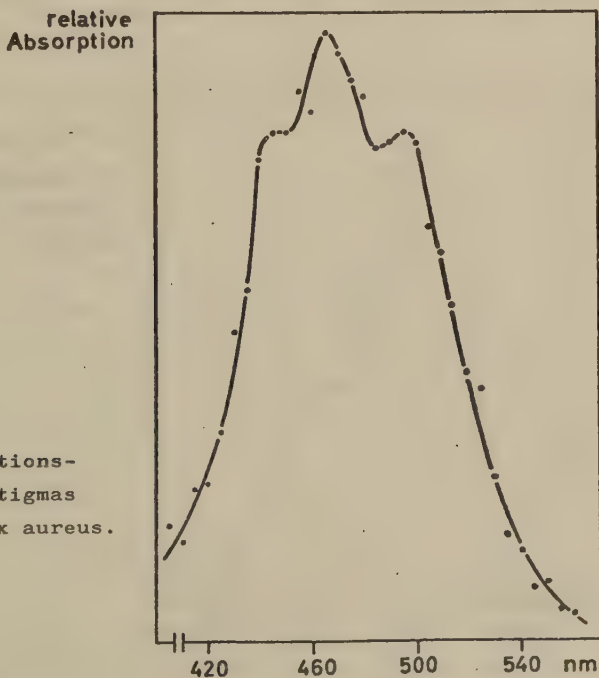


Abb. 7: Absorptionsspektrum des Stigmas in vivo. *Volvox aureus*.

Carotinoidlösung; dies dürfte auf die Inhomogenität der untersuchten Struktur zurückzuführen sein. Das Hauptmaximum liegt bei 465 nm, die Nebengipfel bzw. Schultern bei etwa 440 und 490 nm.

Damit ist es erstmals gelungen, die Carotinoidnatur des Stigmenpigments mikrospektrophotometrisch darzustellen, während die Struktur früher gefundener Absorptionskurven bei *Euglena* (GÖSSEL 1957, STROTHER und WOLKEN 1960 und 1961, COBB 1963) lediglich eine grobe Lokalisierung des Absorptionsmaximums erlaubte. Auffallend ist bei den Kurven von STROTHER und WOLKEN und von COBB die starke Verschiebung der Gipfel in den langwelligen Spektralbereich (um 500 nm), während der von GÖSSEL für *Euglena gracilis* gefundene Maximumsbereich (um 460 nm) sich mit dem des *Volvox* - Stigmas deckt.

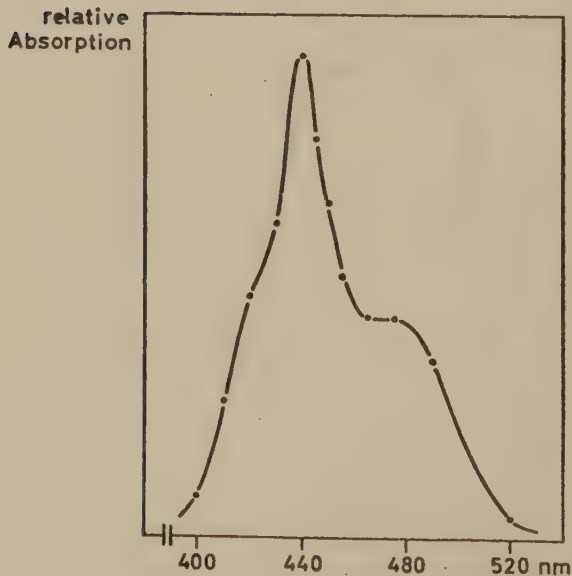


Abb. 8: Absorptionsspektrum des Chloroplasten *in vivo* im kurzwelligen Spektralbereich. *Volvox aureus*.

Chloroplast

Das auf die gleiche Weise gewonnene Absorptionsspektrum des Chloroplasten besitzt ein Maximum bei 440 nm und eine Schulter bei 475 nm, die auf die Chloroplastencarotinoide zurückzuführen ist (Abb. 8). Das Spektrum gleicht, von einer geringfügigen Verschiebung des Maximums in den langwelligen Spektralbereich abgesehen, im wesentlichen dem von STROTHER und WOLKEN (1960 und 1961) für *Euglena gracilis* gefundenen.

Koloniegallerte

Als dritte Struktur kommt für eine Beschattung die Koloniegallerte in Frage, in deren periphere Bezirke die Zellen eingebettet sind. Diese Gallerte erscheint bei Betrachtung

Trans-
mission

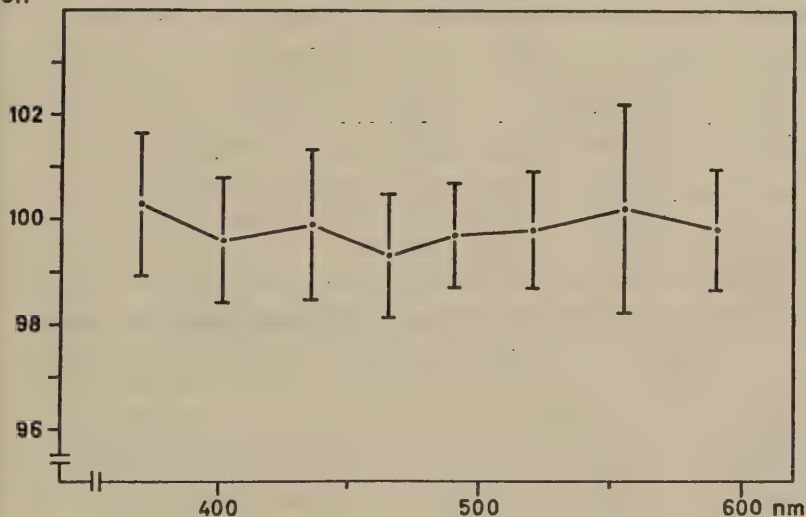


Abb. 9: Transmission der Koloniegallerte. *Volvox aureus*.

im Mikroskop farblos, so daß eine spezifische Absorption im sichtbaren Spektralbereich nicht zu erwarten ist. Die Transmissionskurve (Abb. 9) bestätigt diese Vermutung; wegen ihrer praktisch idealen Transparenz scheidet die Koloniegeallerte somit als Beschattungskörper aus.

Das Absorptionsspektrum des Stigmas und das Aktionsspektrum des Beschattungssystems stimmen nicht überein. Muß daraus geschlossen werden, daß das Stigma nicht als Beschattungskörper fungiert?

Das Stigma liegt bei *Volvox aureus*, wie allgemein bei den Chlorophyta, innerhalb des Chloroplasten, ontogenetisch entstanden durch eine lokale Differenzierung desselben. In voll ausgebildetem Zustand wird das schalenförmige, aus mehreren Lagen von Pigmentglobuli bestehende Stigma vom Membransystem des Chloroplasten durchzogen (DOLZMANN und DOLZMANN 1964, DODGE 1969). Es liegt deshalb der Schluß nahe, daß bei der periodischen Beschattung des Photorezeptors auch die Absorptionseigenschaften des Chlorophylls eine Rolle spielen - eine Möglichkeit, die bereits von HALLDAL (1958) und KIVIC und VESK (1972) diskutiert wurde.

Das Absorptionsmaximum des Chloroplasten (Abb. 8) liegt an der gleichen Stelle wie der kurzwellige Nebengipfel des Absorptionsspektrums des Stigmas. Addiert man beide Spektren, so erhält man eine Kurve, deren Maximum bei 440 nm liegt, also in einem Bereich, in dem auch das Beschattungssystem maximale Wirkung zeigt (Abb. 10). Diese neue, aus den Absorptionseigenschaften von Stigma und Chloroplasten kombi-

nierte Kurve ist demnach als "Absorptionskurve" eines komplexen, aus beiden Strukturen zusammengesetzten Beschattungssystems anzusehen.

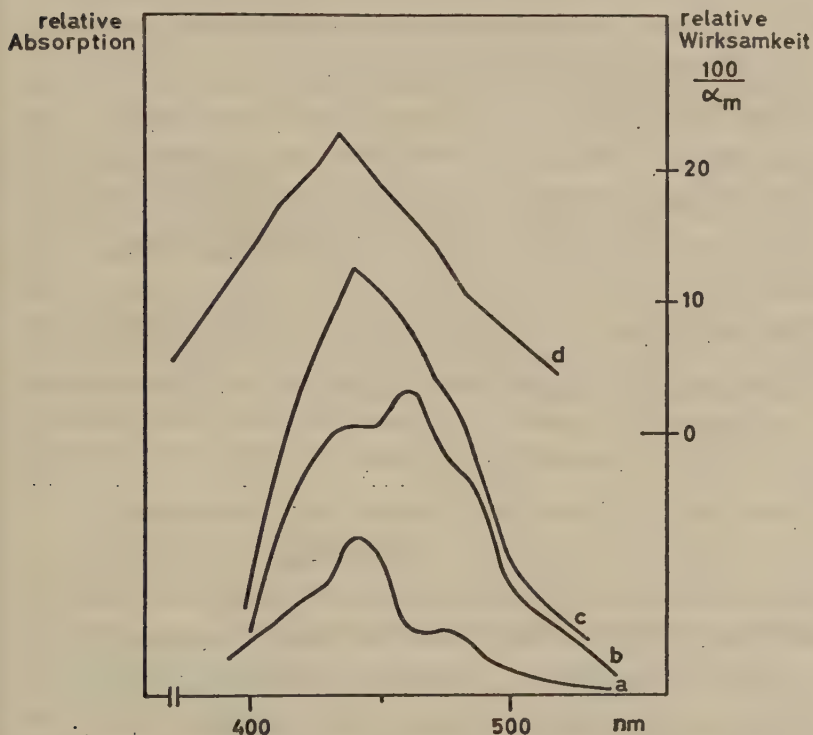


Abb. 10: Aktionsspektrum und Absorptionsspektren des Beschattungspigmentsystems. (a) Chloroplast, (b) Stigma, (c) Kombination aus (a) und (b), (d) Aktionsspektrum des Beschattungssystems.

3. Aktionsspektrum der phobischen Reaktion (Photorezeptor)

Nach der Darstellung des Beschattungssystems mußte es das nächste Ziel sein, das eigentliche Perzeptionssystem der Phototaxis, den Photorezeptor zu untersuchen.

Das Beschattungssystem wirkt bei der Orientierung lediglich als Modulator hinsichtlich der Größe der Intensitätssprünge; die Sperrstellung selbst wird über ein zweites System induziert, das auf der Absorptionswirkung des Photorezeptors beruht.

Die Untersuchung der spektralen Abhängigkeit der Auslösung der phobischen Reaktion müßte deshalb zu einem Aktionsspektrum des Photorezeptors führen mit Hinweisen auf die Absorptionseigenschaften des betreffenden Pigments.

Da hinsichtlich der phobischen Reaktion der Einzelzellen innerhalb der Kolonie sich vom vegetativen zum generativen Pol ein Gradient erstreckt (HAND und HAUPT 1971), sind bei frontaler Belichtung optimale Stopreaktionen zu erwarten. Außerdem sind in diesem Fall die Rezeptoren der vorderen, d.h. phototaktisch aktivsten Zellen, vermutlich mehr oder weniger direkt der Lichtquelle zugewandt, so daß eine Störung durch die Stigmen kaum zu erwarten ist. Die Stopreaktion wurde deshalb an freischwimmenden Kolonien während der phototaktischen Orientierung bei annähernd frontaler Belichtung untersucht.

Die Kolonien wurden phototaktisch angelockt; nach Durchquerung des halben Gesichtsfeldes wurden durch ein am Projektorgehäuse angebrachtes, verschiebbares Filtermagazin Wellenlänge und Intensität gewechselt. Die bei zwei verschiedenen Wellenlängen und gleicher Intensität auftretende Stopreaktion wurde durch eine sukzessive Verringerung der Intensität der wirksameren Wellenlänge kompensiert. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung der Intensitätsquotienten am Umschlagpunkt der Reaktion aus den graphischen Darstellungen. In Vorversuchen wurde zunächst die wirksamste Wellenlänge ermittelt (Stopreaktion bei Verwendung verschiedener Wellenlängen, aber gleicher Intensitäten). Dabei ergab sich ein Maximum der Wirksamkeit im Bereich 480-490 nm. Die Unterschiede sind in diesem Bereich so gering, daß sie mit der angewendeten Methode nicht quantitativ erfaßt werden konnten; als Referenzwellenlänge wurde deshalb etwas willkürlich 482 nm verwendet. Der untersuchte Spektralbereich erstreckte sich von 373 bis 626 nm, wobei die Reaktion von insgesamt mehr als 7000 Kolonien ausgewertet wurde.

Wird eine phototaktisch auf die Lichtquelle zuschwimmende Kolonie einem plötzlichen Wellenlängenwechsel unter Beibehaltung der Intensität ausgesetzt, so wird beim Übergang zur wirksameren Wellenlänge augenblicklich die Bewegung, und zwar sowohl Rotation als auch Translation, eingestellt. Bei einem Wechsel in umgekehrter Richtung ist keinerlei Reaktion zu beobachten. Dieser durch die Sperrstellung der Geißeln hervorgerufene Stillstand der Kolonie dauert unterschiedlich lange, je nach Wirksamkeit der mit der Referenzwellenlänge verglichenen Wellenlänge. Die Dauer der Stopreaktion wurde jedoch nicht berücksichtigt, sondern lediglich registriert, ob und bei welchem Prozentsatz der Kolonien eine entspre-

chende Reaktion überhaupt auftrat.

In der Regel beantworten bei gleichen Intensitäten alle untersuchten Kolonien den Übergang nach 482 nm mit sofortigem Stillstand. Mit abnehmender Intensität (482 nm) nimmt die Zahl der nicht reagierenden Kolonien zu, bis es schließlich bei einem bestimmten Intensitätsverhältnis zur "Inversion"

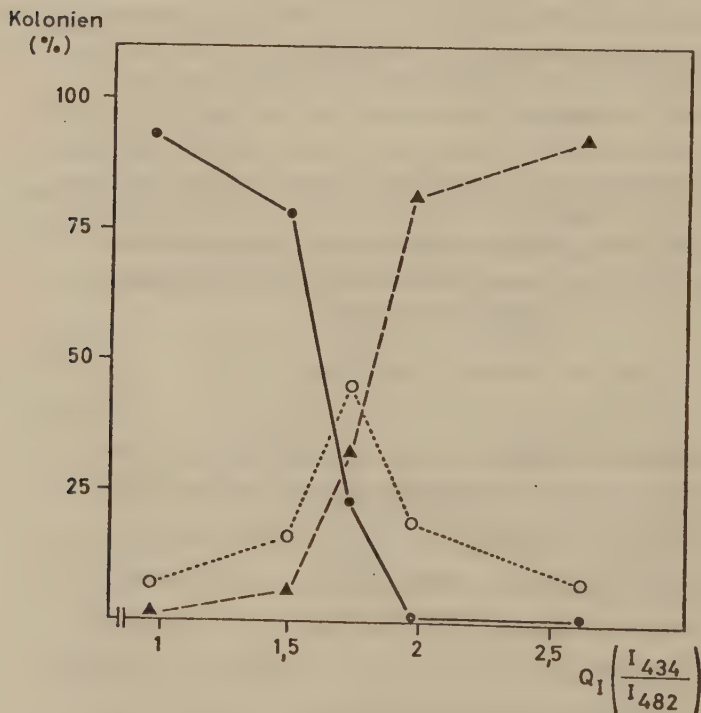


Abb. 11: Abhängigkeit der Richtung der phobischen Reaktion von den relativen Lichtintensitäten bei den Wellenlängen 434 nm und 482 nm. $I_{434\text{nm}} = \text{const. } (2,43 \cdot 10^3 \text{ mW/m}^2)$.

- ————— ● Stopreaktion bei 434 nm —————> 482 nm
- ▲ ————— ▲ Stopreaktion bei 482 nm —————> 434 nm
- ··········· ○ keine Reaktion

der phobischen Reaktion kommt: Die Sperrstellung tritt dann beim Übergang zur weniger wirksamen Wellenlänge ein. Entsprechende Reaktionskurven zeigt Abb. 11.

Als Parameter wurde graphisch der Intensitätsquotient ($\tilde{Q}_I$) am Schnittpunkt der beiden Kurven ermittelt, die den Anteil der Kolonien an den phobischen Reaktionen wiedergeben.

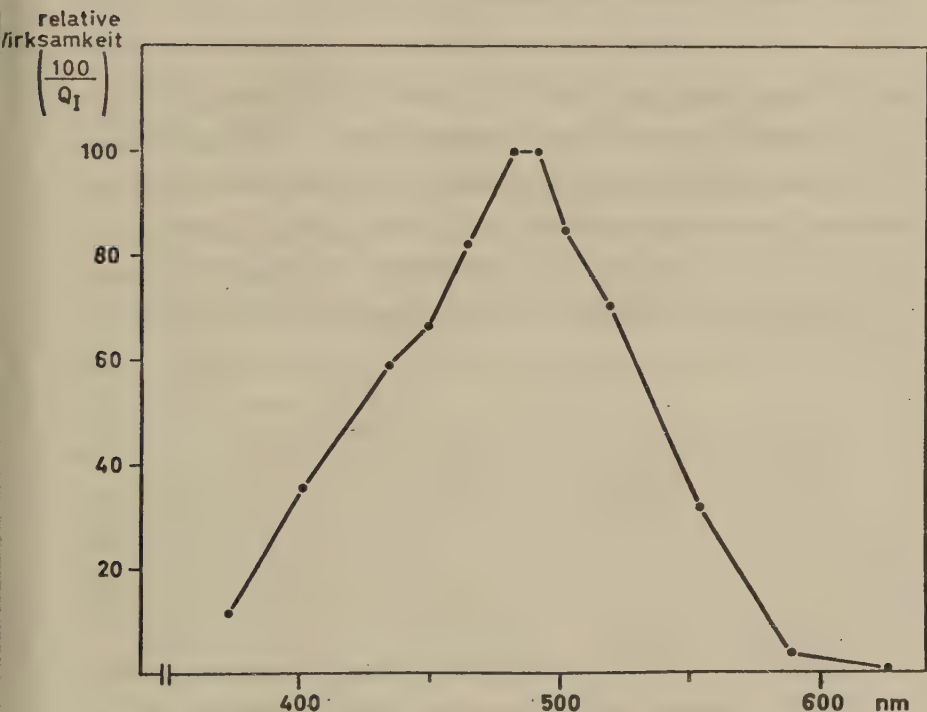


Abb. 12: Aktionsspektrum der phobischen Reaktion (Photorezeptor). Q_I = Intensitätsquotient am Umschlagpunkt der phobischen Reaktion von der wirksameren zur weniger wirksamen Wellenlänge. Referenzwellenlänge: 482 nm.

Das Aktionsspektrum der phobischen Reaktion und damit des Photorezeptors zeigt Abb. 12. Ein deutlich ausgeprägtes Maximum im Bereich 480-490 nm und gleichmäßig abfallende Flanken ohne Feinstruktur kennzeichnen die Kurve. Während der grüne Spektralbereich (554 nm) und langwellige UV-Strahlung noch eine relativ hohe Wirksamkeit besitzen, ist Hellrot (626nm) bereits nahezu unwirksam.

Um die relative Lage der Kurvenpunkte zu überprüfen, wurden umfangreiche Kontrollversuche durchgeführt: Die in der Kurve unmittelbar nebeneinander liegenden Punkte, sowie Punkte von verschiedenen Flanken der Kurve wurden paarweise einem direkten Vergleich unterzogen ($\lambda_1(I_1) \longleftrightarrow \lambda_2(I_1)$). Dabei ergab sich in keinem Fall ein Widerspruch zu der mittels Referenzwellenlänge gefundenen relativen Lage der Kurvenpunkte.

4. Spektrale Abhängigkeit der Schwellenwerte - Aktionsspektrum der positiven Phototopotaxis

Wenn die Phototopotaxis durch Zusammenwirken der beiden Komponenten "Photorezeptor" und "Beschattungssystem" zustande kommt, so sollte ein Aktionsspektrum der Gesamtreaktion Eigenschaften der beiden Systeme widerspiegeln.

Etwas problematisch ist dabei die Wahl eines geeigneten Parameters, der die komplexen Verhältnisse bei der Orientierung wiedergibt. Eine Anwendung des Resultantengesetzes bei Orientierung in rechtwinkelig sich durchsetzenden Strahlenbündeln kommt kaum in Frage, da *Volvox* diesem offenbar nur teilweise folgt (MAST und JOHNSON 1932); hinzu kommt die Berücksichtigung der Linksabweichung, die zudem noch wellenlängenabhängig ist.

Am besten erscheint daher die Untersuchung des Überganges von der ungeordneten in die Orientierungsbewegung geeignet, die spektrale Abhängigkeit der Gesamtreaktion zu analysieren. Es gilt also, die minimalen absoluten Intensitäten zu suchen, die gerade ausreichen, um den zur Orientierung notwendigen Apparat "einzuschalten". Dieses Verfahren beruht im Prinzip auf der von LUNTZ (1931a) angegebenen Bestimmung der Richtungsschwellen.

Der Lichtstrahl aus dem Monochromator traf auf einen um seine vertikale Achse um 90° schwenkbaren Spiegel, so daß das Reizlicht alternativ zur Versuchsküvette und zum Strahlungsmeßgerät (Spectra Pritchard Photometer 1980 mit FAI-160-cos-

Vorsatz) geleitet werden konnte. Durch Röhren und Blenden war die Küvette vollständig gegen Streulicht abgeschirmt. Die mit Nährlösung gefüllte Küvette wurde auf dem Mikroskop jeweils mit 10 - 20 Kolonien beschickt; danach erfolgte 5 Minuten Adaptation bei völliger Dunkelheit und eingeschalteter Mikroskopbeleuchtung (681 nm). Nach Einschalten des Reizlichtes wurde innerhalb von 60 Sekunden die Zahl der positiv phototaktisch und der nicht reagierenden Kolonien bestimmt. In einem durch Vorversuche ermittelten Schwellenbereich wurden bei jeder Wellenlänge die Intensitäten variiert, wobei für jede Intensität 100 Kolonien ausgewertet wurden. Der Schnittpunkt der auf diese Weise erhaltenen Dosis-effektkurven mit der 50%-Marke positiv reagierender Kolonien wurde als Schwelle definiert. Die Ergebnisse beruhen auf der Reaktion von mehr als 10 000 Kolonien.

Unter Einwirkung des Reizlichtes geht die ungeordnete Bewegung der Kolonien meist sehr schnell in eine topotaktische Orientierung über. Die Schnelligkeit dieses Überganges hängt außer von der Wellenlänge sicher auch von der Intensität des Reizlichtes ab (FEINLEIB und CURRY 1971b, NULTSCH et al. 1971, STAVIS 1974). War innerhalb einer Minute noch keine Reaktion eingetreten, so führte auch eine längere Belichtung nicht mehr dazu. Somit wird im Schwellenbereich nicht eine bestimmte "Lichtmenge" ($I \cdot t$), sondern eine Intensität benötigt, die eine bestimmte Mindestgröße überschreitet.

Im Schwellenbereich führt Intensitätszunahme zu steigenden Prozentsätzen von Kolonien, die phototaktisch orientiert sind (Abb. 13). Der Anstieg dieser sigmoiden Dosiseffektkurven vollzieht sich in einem Intensitätsbereich, dessen Breite vom unterschiedlichen Entwicklungszustand der einzelnen Kolonien und von "Stimmungsänderungen" durch Außenfaktoren abhängt (MAINX 1929). Durch Verwendung sehr vieler Ko-

pos. Photo-
topotaxis
(Kolonien)

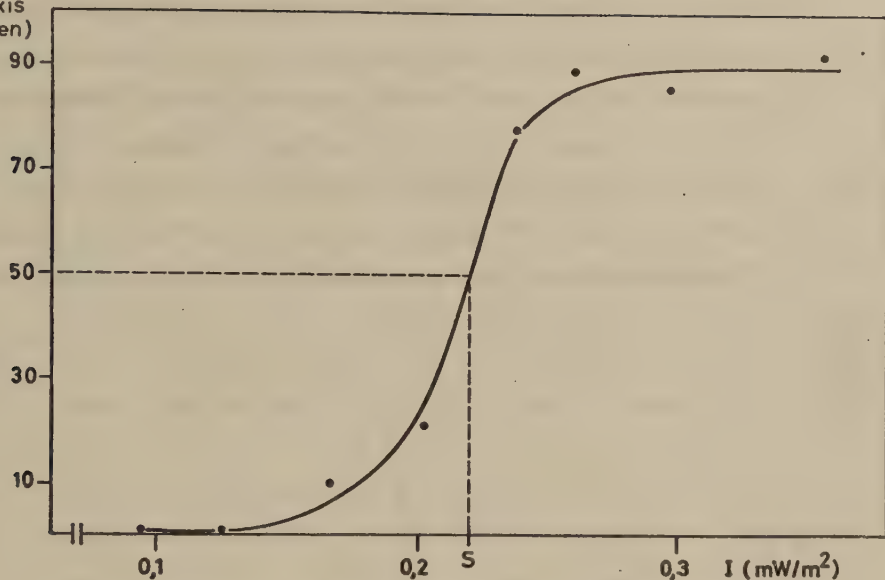


Abb. 13: Dosis-effektkurve der positiven Phototopotaxis im Schwellenbereich für $\lambda = 433$ nm. S = Schwelle.

lonien aller Entwicklungsstufen und weitgehende Konstanz der Versuchsbedingungen konnte jedoch eine recht präzise Bestimmung der "Richtungsschwellen" erzielt werden.

Das sich aus den einzelnen Dosis-effektkurven ergebende Aktions-spektrum der positiven Phototopotaxis besitzt ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei 491 nm und eine Schulter bei 433 nm (Abb. 14).

Die Schwellenwerte liegen im wirksamsten Spektralbereich bei sehr niedrigen Intensitäten, so für 491 nm bei $0,077 \text{ mW/m}^2$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von LUNTZ (1931a) für

Volvox minor gefundenen minimalen Schwellenwert ($0,06 - 0,10 \text{ mW/m}^2$ bei 492 nm) überein. Auch die Lage des Maximums deckt sich mit den von LUNTZ (1931a) und von LAURENS und HOOKER (1920) für Volvox globator gefundenen Ergebnissen. Entsprechende Befunde anderer Autoren (MAST 1917, HALLDAL 1958, NULTSCH et al. 1971) deuten die Möglichkeit an, daß bei den Volvocales generell das phototaktische Wirkungsmaximum im

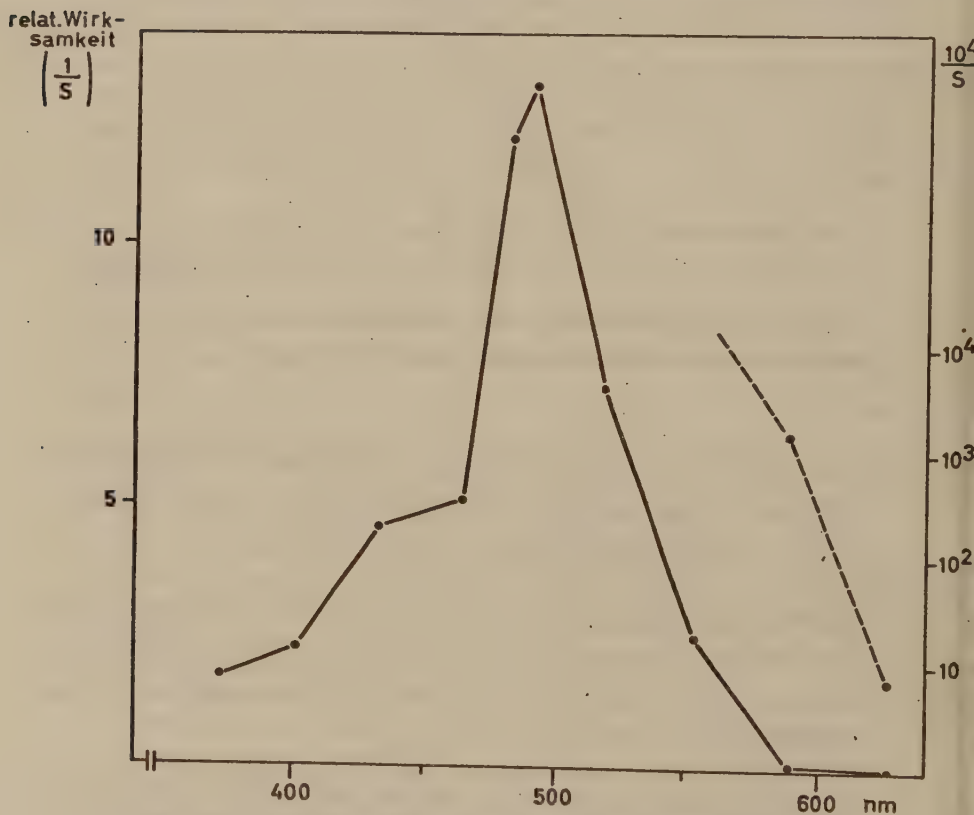


Abb. 14: Aktionsspektrum der positiven Phototopotaxis.
S = Schwellenwert in mW/m^2 .

Blaugrün bei 490-500 nm liegt.

Im langwelligen Teil des Spektrums nehmen die Schwellenwerte sehr rasch an Größe zu; bei 626 nm liegt die Schwelle bereits um den Faktor $1,8 \cdot 10^4$ höher als im Maximum. Immerhin ist die Tatsache bemerkenswert, daß bei 626 nm, also in Hellrot, überhaupt noch eine positiv phototaktische Reaktion auftritt: Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur überwiegenden Mehrzahl der bisherigen Befunde, wonach Phototaxis in Rotlicht nicht möglich sei (z.B. NULTSCH et al. 1971, DIEHN 1969). Bei der nächsten daraufhin untersuchten Wellenlänge (652 nm) war auch bei der höchsten einstellbaren Intensität (ca. 6000 mW/m^2) keinerlei Reaktion mehr zu erreichen.

Weiterhin ist auf die relativ hohe Wirksamkeit im kurzwelligen Blau hinzuweisen, besonders auf die Schulter bei 433 nm. Schultern in diesem Bereich wurden auch von HALLDAL (1958) für *Platymonas*, *Dunaliella* und *Stephanoptera* und von NULTSCH et al. (1971) für *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden. Ihre Lage stimmt mit der des Wirkungsmaximums des Aktionsspektrums des Beschattungssystems überein, so daß die kurzwellige Asymmetrie des phototaktischen Aktionsspektrums auf Wirkungen des Beschattungssystems zurückzuführen ist.

Das phototaktische Hauptmaximum deckt sich dagegen mit dem der phobischen Reaktion (Photorezeptor). Somit spiegelt das Aktionsspektrum der positiven Phototaxis in seiner Struktur die Eigenschaften der Pigmentsysteme wider, die in komplexer Weise am Zustandekommen der phototaktischen Orientierung beteiligt sind (Abb. 15).

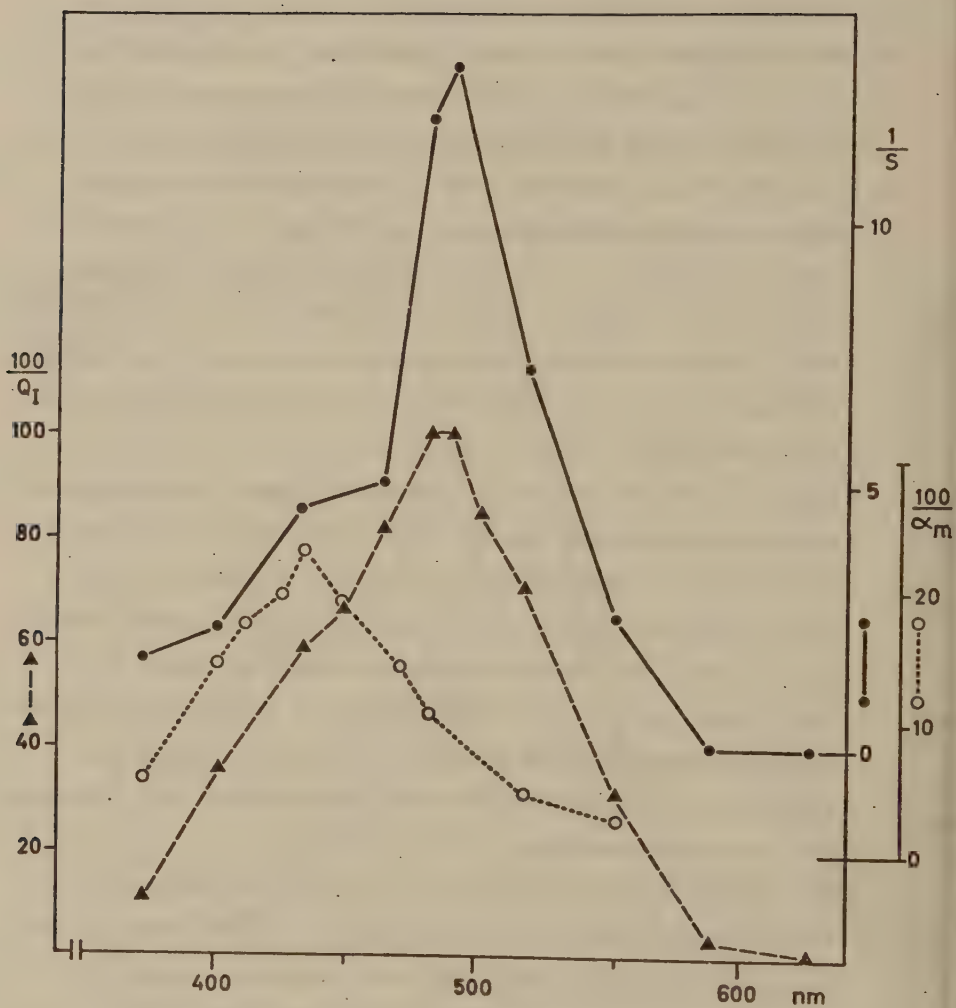


Abb. 15: ○.....○ Aktionsspektrum des Beschattungssystems, ▲-----▲ Aktionsspektrum der phobischen Reaktion (Photorezeptor), ●-----● Aktionsspektrum der positiven Phototaxis.

5. Pigmentanalyse

Im Hinblick auf die Rotlichtwirkung bei der Phototaxis und, um eventuell einen Hinweis auf die chemische Natur des Stigmenpigments zu erhalten, wurde abschließend eine Pigmentanalyse von *Volvox aureus* durchgeführt. Dabei wurden lediglich die Chlorophylle und Carotinoide berücksichtigt.

relative
Absorption

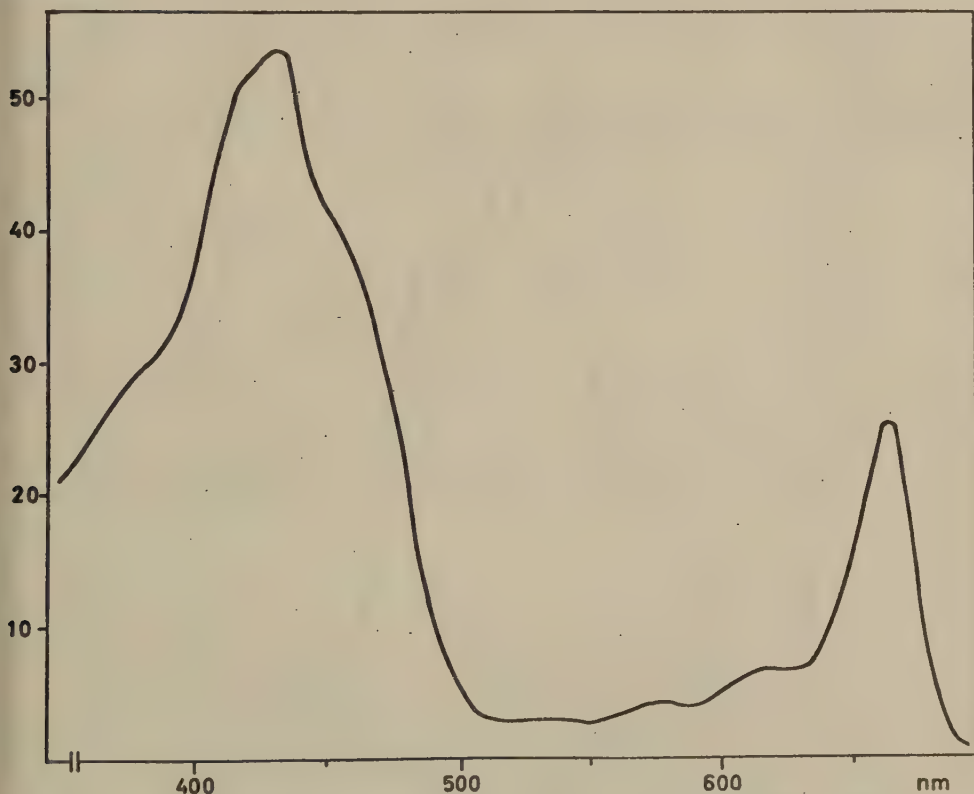


Abb. 16: Absorptionsspektrum der Gesamtpigmente in 80% Aceton. *Volvox aureus*.

Das Absorptionsspektrum des Gesamtextraktes in Aceton (Abb. 16) zeigt die für Grünalgen typische Struktur: Chlorophyll a und b und Carotinoidschulter bei etwa 455 nm.

Der Gehalt an Gesamtchlorophyll pro ml Suspension betrug 1,45 %, entsprechend 18 mg Chlorophyll (a+b) pro Gramm Trockengewicht und einem Verhältnis Chlorophyll a : Chlorophyll b von 2,5 : 1.

Auch das Absorptionsspektrum der Gesamtcarotinoide besitzt eine charakteristische Struktur: Zwei Gipfel bei 441 nm (Maximum) und 469 nm und eine Schulter bei 418 nm (Abb. 17).

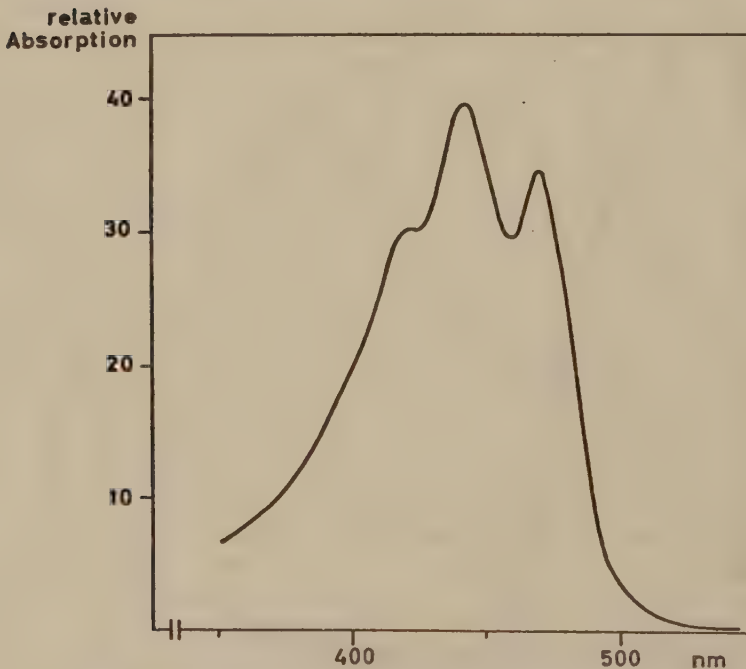


Abb. 17: Absorptionsspektrum der Gesamtcarotinoide in Diäthyläther. *Volvox aureus*.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamtcarotinoide ergibt fünf Banden, die im Vergleich mit einem Parallellauf eines entsprechend präparierten Extraktes von *Chlorella vulgaris* (Cochromatogramm) als Carotine, Lutein, Lutein-4,5-epoxid, Violaxanthin und Neoxanthin identifiziert werden konnten (Abb. 18).

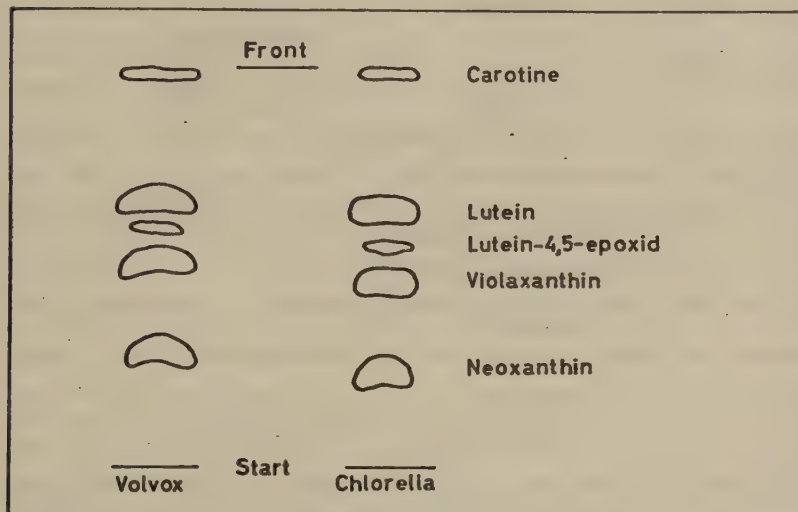


Abb. 18: Dünnschichtchromatogramm eines Parallellaufes der Gesamtcarotinoide von *Volvox aureus* und *Chlorella vulgaris*.

Die Carotinbande enthält vermutlich überwiegend β -Carotin neben etwas α -Carotin; ob im Extrakt auch Zeaxanthin und Antheraxanthin vorhanden sind, konnte nicht entschieden werden, da diese Pigmente in den Lutein- bzw. Luteinepoxidbanden mitlaufen. Die geringfügige gegenseitige Verschiebung der Banden im unteren Bereich des Chromatogrammes ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Wassergehalt der beiden

Extrakte zurückzuführen; an der Identität der Pigmentmuster kann jedoch kein Zweifel bestehen. Qualitativ stimmt somit die Ausstattung an Massenzpigmenten mit der der bisher daraufhin untersuchten Vertreter der Chlorophyta überein (z.B. GOODWIN 1964).

Bandenfolge	Pigment	mg pro Gramm Trockengewicht	%
1	$\alpha(?)$ - $\rightarrow\beta$ -Carotin	0,4	7
2	Lutein(+Zeaxanthin?)	3,2	56
3	Lutein-4,5-epoxid (+Antheraxanthin?)	0,2	4
4	Violaxanthin	1,3	23
5	Neoxanthin	0,6	10
	Summe	5,7	100

Tab.: Anteil der einzelnen Banden am Gesamtcarotinoidgehalt.

Der Gesamtcarotinoidgehalt betrug 5,7 mg pro Gramm Trockengewicht, das Verhältnis Carotinoide/Chlorophyll 0,3 : 1. In obiger Tabelle ist der quantitative Anteil der einzelnen Banden am Gesamtgehalt wiedergegeben.

Die Frage nach der Natur des Stigmenpigments kann nicht eindeutig beantwortet werden, da alle gefundenen Carotinoide dafür in Betracht kommen, obwohl deren in-vitro-Spektren mehr oder weniger vom Stigmenpektrum am lebenden Objekt (Abb. 7) abweichen. Solche Verschiebungen zwischen in-vivo-

und in-vitro - Absorption sind allgemein bekannt; sie könnte hier auf einen elektrochromen Effekt zurückzuführen sein, wonach oft erhebliche Absorptionsdifferenzen auftreten (z.B. EMRICH, JUNGE und WITT 1969). Außerdem ist die Lage der Absorptionsmaxima sehr stark von der Art des Lösungsmittels abhängig (z.B. DAVIES 1965).

Am ehesten scheinen Lutein und Violaxanthin in Frage zu kommen, da deren Spektren noch die größte Ähnlichkeit mit dem in-vivo - Absorptionsspektrum (Abb. 7) haben; außerdem spricht ihr hoher Anteil an den Gesamtcarotinoiden dafür. Jedenfalls hat sich damit die früher verbreitete Ansicht, die Stigmen der Flagellaten enthielten allgemein Astaxanthin (z.B. HEILBRON 1942), erneut als fragwürdig erwiesen, nachdem bereits GOODWIN und JAMIKORN (1954), KRINSKY und GOLDSMITH (1960) und BATRA und TOLLIN (1964) dieses Pigment bei Euglena nicht finden konnten.

Aus Abb. 16 geht auch hervor, daß Chlorophyll nicht für die gefundene phototaktische Reaktion in Rotlicht (626 nm) verantwortlich gemacht werden kann: Die Absorption des Chlorophylls ist an dieser Stelle sehr gering und nimmt darüber hinaus in jenen Spektralbereich (652 nm) hinein stark zu, in dem eine phototaktische Aktivität nicht mehr feststellbar ist.

IV. Diskussion

Durch den experimentellen Nachweis der Abhängigkeit der Abweichwinkel von der Wellenlänge konnte gezeigt werden, daß bei der Orientierung nach dem Prinzip der periodischen Beschattung die Intensität des Reizlichtes am Photorezeptor durch ein aus Stigma und Chloroplast bestehendes Beschattungssystem moduliert wird. Das sich daraus ergebende Aktionspektrum des Beschattungssystems beruht ausschließlich auf dessen Absorptionseigenschaften, da die Abweichwinkel in monochromatischem Licht nicht von der Intensität beeinflußt werden (Abb. 2).

Auch die Möglichkeit einer eventuellen Überlagerung dieses Aktionsspektrums durch einen photokinetischen Effekt ist ausgeschlossen, da ein solcher im verwendeten Intensitätsbereich nicht auftritt (Abb. 6). Nach Befunden von HOLMES (1903), LAURENS und HOOKER (1920), LUNTZ (1931b), MAINX und WOLF (1940), HAXO und CLENDENNING (1953) und WOLKEN und SHIN (1958) muß jedoch eine Photokinesis bei Phytoflagellaten im Sinne von NULTSCH (1974) als gesichert angesehen werden. Es liegt deshalb der Schluß nahe, daß die vorliegenden Versuche im Sättigungsbereich durchgeführt wurden. Voraussetzung ist dann allerdings, daß die bei Saturierung erreichte Geschwindigkeit bei allen Wellenlängen gleich ist und daß die Dosiseffekt-kurven keine Optimums-, sondern Sättigungskurven sind. LUNTZ (1931b) findet für Eudorina, daß die photokinetische

Sättigung jeweils bei einer Intensität eintritt, die dem 10^3 -fachen phototaktischen Schwellenwert entspricht. Nimmt man an, daß dieser Faktor bei Volvox in der gleichen Größenordnung liegt, so befinden sich die 1000-fachen Schwellenwerte im untersuchten Bereich alle unter der Versuchsintensität von 500 mW/m^2 . Damit wäre die Bedingung dafür erfüllt, daß in diesem Fall keine photokinetischen Wirkungen feststellbar sind.

Das Stigmenpigment kommt mit Sicherheit nicht als Photorezeptor in Frage, da zwischen seinem Absorptionsspektrum und dem Aktionsspektrum der phobischen Reaktion keinerlei Übereinstimmung besteht. Diesbezügliche Vermutungen von MAST (1927), LUNTZ (1931a), GERISCH (1959) und STROTHER und WOLKEN (1961) werden auch durch die Ergebnisse von HARTSHORNE (1953) und GÖSSEL (1957) widerlegt. Zweifellos ist das Stigmenpigment ein Carotinoid, dessen Identität jedoch nicht festgestellt werden konnte.

Somit scheint die Rolle des Stigmas als Beschattungskörper vor allem darin zu bestehen, durch Vergrößerung der Intensitätssprünge am Photorezeptor eine bessere Orientierung zu erreichen: Nach Verlust des Stigmas wird die Fähigkeit zur Phototaxis zwar erhalten, die Orientierung jedoch wesentlich verschlechtert (HARTSHORNE 1953), so daß die Vermutung nahe liegt, daß der Chloroplast der phylogenetisch primäre Beschattungskörper war, dessen Absorptionswirkung durch den zusätzlichen Erwerb eines Stigmas erhöht wurde.

Was die Natur des eigentlichen Photorezeptors angeht, so werden für die Phototaxis zwei Möglichkeiten diskutiert:

1. Ein Flavin (DIEHN 1969, TOLLIN und ROBINSON 1969, DIEHN und KINT 1970);
2. ein Carotinoid bzw. Carotinoprotein (MAYER und POLJAKOFF-MAYBER 1959, HALLDAL 1961 und 1963, FORWARD 1973).

Das vorliegende Aktionsspektrum der photischen Reaktion, das auf Wirkungen des Photorezeptors zurückzuführen ist, läßt keinerlei Anzeichen dafür erkennen, daß es sich hier um ein Flavin handeln könnte. Vor allem der fehlende Wirkungsanstieg im langwelligen UV und die Lage des Maximums bei 480-490 nm machen eine solche Möglichkeit unwahrscheinlich. Trotz der schwerwiegenden Einwände, die von SONG und MOORE (1974) gegen die Carotinoid - Natur eines phototaktischen Photorezeptors erhoben werden, muß eine solche für *Volvox* zunächst angenommen werden. Dies wäre auch mit der Wirkung im hellroten Spektralbereich (626 nm) vereinbar, da es Carotinoide gibt, die in diesem Bereich noch Absorption zeigen (z.B. Astacin; BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN 1956). Allerdings absorbieren auch gewisse Flavin - Protein - Komplexe unter bestimmten Umständen (in Semichinonform; z.B. Glucose-oxidase) noch geringfügig im roten Spektralbereich (EDMONDSON und TOLLIN 1971).

Jedenfalls kann dieser Rotlichteffekt nicht auf eine photosynthetische Chlorophyllwirkung zurückgeführt werden, da das Chlorophyll an dieser Stelle nur relativ schwach absorbiert und im Bereich maximaler Absorption (662 nm) keine Phototaxis mehr feststellbar ist. Es handelt sich hierbei also um eine echte phototaktische Orientierungsreaktion.

Die Literaturangaben über eine Beteiligung der Photosynthese an der Phototaxis widersprechen sich zwar teilweise, doch scheinen die Befunde von MARBACH und MAYER (1970) und besonders von STAVIS und HIRSCHBERG (1973) an *Chlamydomonas* eine solche Beteiligung auszuschließen. Die von CHECCUCCI et al. (1974) beschriebene Ansammlung von *Euglena* in Rotlicht (676 nm) kann als Aerotaxis interpretiert werden; dies gilt vermutlich auch für die langwellige Wirkung im Aktionsspektrum von WOLKEN und SHIN (1958). Schließlich kommt Phototaxis auch bei chlorophyllfreien Flagellaten vor (LUNTZ 1931a, GÖSSEL 1957, STAVIS und HIRSCHBERG 1973).

ARNOTT und BROWN (1967) konnten in der Zoospore von *Tetracystis excentrica* gegenüber dem Stigma eine Verdickung des Plasmalemmas, die sie als Sitz des Photorezeptors interpretierten, und einen ribosomenfreien Raum zwischen Plasmamembran und Stigma feststellen. Auf bisher vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Volvox*, die diese Region zeigen (DOLZMANN und DOLZMANN 1964, DEASON et al. 1969, PICKETT-HEAPS 1970) sind entsprechende Strukturen nicht zu erkennen. Trotzdem ist der Photorezeptor in der cytoplasmatischen Membran gegenüber der konkaven Seite des Stigmas zu suchen, da nur eine derartige Lagebeziehung die Befunde im Zusammenhang mit dem Aktionsspektrum des Beschattungssystems befriedigend erklären kann (Abb. 19). Nur in diesem Fall scheint eine Wechselwirkung Beschattungssystem - Photorezeptor über periodische phototaktische Reaktionen an den Einzelzellen in Verbindung mit dem Ruderbootmechanismus zur phototopotaktischen Orientierung zu führen.

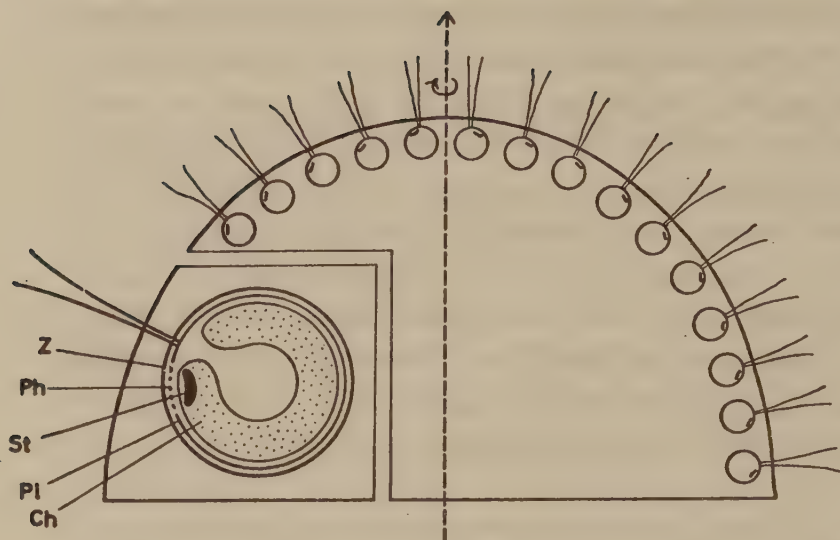


Abb. 19: Längsschnitt durch die vegetative Hemisphäre einer Volvox-Kolonie, im Ausschnitt Einzelzelle; schematisch.
Ch: Chloroplast, Ph: Photorezeptorbezirk, Pl: Plasmalemma, St: Stigma, Z: Zellwand.

In Frage käme theoretisch auch eine Lokalisierung unmittelbar im konkaven Stigmenbereich, also noch innerhalb des Chloroplasten. Die Probleme, die sich in diesem Fall hinsichtlich einer Erregungsleitung zur Geißelbasis ergeben würden, machen dies jedoch unwahrscheinlich.

Auf welche Weise aber vollzieht sich nun die Erregungsleitung zu den "Erfolgsorganen" der Orientierung, den Geißeln? Eine direkte Verbindung des (vermutlichen) Photorezeptors mit dem Kinetosom durch Mikrotubuli, wie sie von KAZAMA (1972) bei Phlyctochytrium - Zoosporen beschrieben wurde, existiert bei

Volvox sicherlich nicht. Auch ein System an der Peripherie längs verlaufender Mikrotubuli (RINGO 1967) kommt hierfür kaum in Frage, da eine Assoziation mit dem Photorezeptor fehlt.

Günstiger ist dagegen eine Beteiligung der Plasmamembran zu beurteilen, da über diese eine direkte Verbindung zu den Geißeln besteht. Während ein sich vom Photorezeptorbezirk über die Membran ausbreitendes Aktionspotential eine generelle Erregbarkeit der Membran voraussetzen würde und deshalb unwahrscheinlich ist, wäre eine Erregungsleitung passiver Art, also mit Dekrement, über die Membran denkbar. Die meisten Vorzüge scheint jedoch folgender hypothetischer Mechanismus auf sich zu vereinen:

Über eine durch die Absorptionswirkung des Photorezeptors ausgelöste lokale Permeabilitätserhöhung kommt es zu einem starken Influx bestimmter Ionen, die zu den Geißelbasen diffundieren und dort (über ATPase-Inaktivierung?) die phobische Reaktion auslösen. Die wichtige Rolle, die gewisse Ionen bzw. Ionenverhältnisse bei der phototaktischen Orientierung spielen, ist bekannt (HALLDAL 1959). Auch auf die elektrochemischen Vorgänge in Verbindung mit Ionenflüssen an den Rezeptormembranen der Evertabraten-Lichtsinneseellen sei in diesem Zusammenhang hingewiesen (z.B. STIEVE 1974). Die Schnelligkeit, mit der phobische Reaktionen eintreten, ist durchaus vereinbar mit der Diffusionsdauer, die in der Größenordnung von 10 Millisekunden liegen dürfte, wenn man eine Strecke von $4 \mu\text{m}$ und einen Diffusionskoeffizienten von $10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ zugrunde legt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, die sich eingehend mit diesem Problem befassen.

V. Zusammenfassung

1. Die an der phototopotaktischen Orientierung beteiligten Pigmentsysteme, Photorezeptor und Beschattungssystem, werden durch Aufnahme verschiedener Wirkungs- und Absorptionsspektren differenzierend dargestellt.

2. Die Größe der Linksabweichung in Bezug auf die Richtung des Orientierungslichtes beruht auf den Absorptionseigenschaften des Beschattungssystems und ist daher in monochromatischem Licht von der Wellenlänge abhängig. Das sich daraus ergebende Aktionsspektrum des Beschattungssystems besitzt ein Maximum (minimalen Abweichwinkeln entsprechend) bei 434 nm.

3. Das Absorptionsmaximum des Stigmas liegt bei 465 nm, das (kurzwellige) des Chloroplasten bei 440 nm, während die Koloniegallerte im sichtbaren Bereich keine spezifische Absorption aufweist. Ein Vergleich der kombinierten Absorptionskurve von Stigma und Chloroplast mit dem Aktionsspektrum des Beschattungssystems zeigt, daß dieses sich in komplexer Weise aus der Wirkung der beiden Organellen zusammensetzt.

4. Das Aktionsspektrum des Photorezeptors ergibt sich aus der spektralen Abhängigkeit der photischen Reaktion (Sperrstellung der Geißeln). Es besitzt ein Maximum bei 480-490 nm und erstreckt sich bis in den hellroten Spektralbereich (626 nm).

5. Das Maximum des Aktionsspektrums der positiven Phototaxis liegt bei 491 nm; bei 433 nm befindet sich eine zusätzliche Schulter. Maximum und Schulter stimmen in ihrer Lage mit den entsprechenden Wirkungsmaxima von Beschattungssystem und Photorezeptor überein. Noch in Hellrot (626 nm) ist phototaktische Orientierung feststellbar.

6. Eine Analyse der Massenzpigmente von *V. aureus* (Chlorophylle und Carotinoide) zeigt die für Grünalgen charakteristische Zusammensetzung.

7. Die Lagebeziehung der Pigmentsysteme und mögliche Mechanismen der Erregungsleitung zu den Geißeln werden diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

- ARNOTT, H.J., and R.M. BROWN: Ultrastructure of the eyespot and its possible significance in phototaxis. J. Protozool. 14, 529-539 (1967).
- BATRA, P.P., and G. TOLLIN: Phototaxis in *Euglena*. I. Isolation of the eyespot granules and identification of the eyespot pigments. Biochim. Biophys. Acta 79, 371-378 (1964).
- BÜNNING, E. und G. SCHNEIDERHÖHN: Über das Aktionsspektrum der phototaktischen Reaktionen von *Euglena*. Arch. Mikrobiol. 24, 80-90 (1956).
- CHECCUCCI, A., G. COLOMBETTI, G. DELCARRATORE, R. FERRARA, and F. LENCI: Red light-induced accumulation of *Euglena gracilis*. Photochem. Photobiol. 19, 223-226 (1974).
- COBB, H.D.: An in vivo absorption spectrum of the eyespot of *Euglena mesnili*. Tex. J. Sci. 60, 231-235 (1963).
- DAVIES, B.H.: Analysis of carotenoid pigments. In: Biochemistry of Plant Pigments (Ed. T.W. Goodwin), 489-532. Acad. Press, Lond. and N.Y., (1965).
- DEASON, T.R., W.H. DARDEN, and S. ELY: The development of sperm packets of the M5 strain of *Volvox aureus*. J. Ultrastruct. Res. 26, 85-94 (1969).
- DIEHN, B.: Action spectra of phototactic responses in *Euglena*. Biochim. Biophys. Acta 177, 136-143 (1969).
- and B. KINT: The flavin nature of the photorezeptor molecule for phototaxis in *Euglena*. Physiol. Chem. Phys. 2, 483-488 (1970).
- DODGE, J.D.: A review of the fine structure of algal eyespots. Br. Phycol. J. 4, 199-210 (1969).
- DOLZMANN, R. und P. DOLZMANN: Untersuchungen über die Feinstruktur und die Funktion der Plasmodesmen von *Volvox aureus* L. Planta 61, 332-346 (1964).

- EDMONDSON, D.E., and G.TOLLIN: Circular dichroism studies of the flavin chromophore and of the relation between redox properties and flavin environment in oxydases and dehydrogenases. *Biochemistry* 10, 113-123 (1971).
- EMRICH, H.M., W.JUNGE, and H.T.WITT: Further evidence for an optical response of chloroplast bulk pigments to a light induced electrical field in photosynthesis. *Z. Naturforschg.* 24b, 1144-1146 (1969).
- FEINLEIB, M.E.H., and G.M.CURRY: The nature of the photoreceptor in phototaxis. In: *Handbook of Sensory Physiology, I. Receptor Mechanisms* (Ed. W.R.Loewenstein), 366-395. Springer, Heidelberg (1971a).
- - The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*. *Physiol. Plant.* 25, 346-352 (1971b).
- FORWARD, R.B.: Phototaxis in a dinoflagellate: Action spectra as evidence for a two-pigment system. *Planta* 111, 167-178 (1973).
- GERISCH, G.: Die Zelldifferenzierung bei *Pleodorina californica* SHAW und die Organisation der Phytomonadenkolonien. (Über Entwicklung, Koloniebau, Zellasymmetrie und Phototaxis der Phytomonaden). *Arch. Protistenk.* 104, 292-358 (1959).
- GÖSSEL, I.: Über das Aktionsspektrum der Phototaxis chlorophyllfreier Euglenen und über die Absorption des Augenfleckes. *Arch. Mikrobiol.* 27, 288-305 (1957).
- GOODWIN, T.W.: The plastid pigments of flagellates. In: *Biochemistry and physiology of protozoa* (Ed. S.H.Hutner), Vol. 3, 319-339. Acad. Press, N.Y. (1964).
- and M. JAMIKORN: Studies in carotenogenesis. Some observations on carotenoid synthesis in two varieties of *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 1, 216-219 (1954).
- HALLDAL, P: Action spectra of phototaxis and related problems in volvocales, *Ulva* gametes and dinophyceae. *Physiol. Plant.* 11, 118-153 (1958).

- HALLDAL, P.: Factors affecting light response in phototactic algae. *Physiol. Plant.* 12, 742-752 (1959).
- Ultraviolet action spectra of positive and negative phototaxis in *Platymonas subcordiformis*. *Physiol. Plant.* 14, 133-139 (1961).
 - Zur Frage des Photorezeptors bei der Topophototaxis der Flagellaten. *Ber.Dt.Bot.Ges.* 76, 323-327 (1963).
- HAND, W.G., and W.HAUP: Flagellar activity of the colonial members of *Volvox aureus* Ehrb. during light stimulation. *J. Protozool.* 18, 361-364 (1971).
- HARTSHORNE, J.N.: The function of the eyespot in *Chlamydomonas*. *New Phytol.* 52, 292-297 (1953).
- HAUP, W.: Die Phototaxis der Algen. In: *Hdb. d. Pflanzenphysiol.* (Ed. W.Ruhland) XVII/1, 318-370. Springer, Berl.-Gött.-Heidelb. (1959).
- Phototaxis in plants. *Inter. Rev. Cyt.* 19, 267-299. Acad. Press, N.Y. (1966).
- HAXO, F.T., and K.A.CLENDENNING: Photosynthesis and phototaxis in *Ulva lactuca* gametes. *Biol. Bull.* 105, 103-114 (1953).
- HEILBRON, I.M.: Some aspects of algal chemistry. *J. Chem. Soc.*, Part I, 79-89 (1942).
- HOLMES, S.J.: Phototaxis in *Volvox*. *Biol. Bull.* 4, 319-326 (1903).
- HUTH, K.: Bewegung und Orientierung bei *Volvox aureus* Ehrb. I. Mechanismus der phototaktischen Reaktion. *Z. Pflanzenphysiol.* 62, 436-450 (1970a).
- Bewegung und Orientierung bei *Volvox aureus* Ehrb. II. Richtungsabweichung bei taktischen Reaktionen. *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 344-351 (1970b).
- KAZAMA, F.Y.: Ultrastructure and phototaxis of the zoospores of *Phlyctochytrium* sp., an eustuarine chytrid. *J. Gen. Microbiology* 71, 555-566 (1972).

- KIVIC, P.A., and M.VESK: Structure and function in the euglenoid eyespot (The probable location of the phototaxis photoreceptor). J. Exp. Bot. 23, 1070-1075 (1972).
- KRINSKY, N.I., and T.H.GOLDSMITH: The carotenoids of the flagellated alga, *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 91, 271-279 (1960).
- LAURENS, H., and H.D.HOOKER: Studies on the relative physiological value of spectral lights. II. The sensibility of *Volvox* to wavelengths of equal energy content. J. Exp. Zool. 30, 345-368 (1920).
- LUNTZ, A.: Untersuchungen über die Phototaxis. I. Mitteilung: Die absoluten Schwellenwerte und die relative Wirksamkeit von Spektralfarben bei grünen und farblosen Einzelligen. Z. Vergl. Physiol. 14, 68-92 (1931a).
- Untersuchungen über die Phototaxis. II. Lichtintensität und Schwimmgeschwindigkeit bei *Eudorina elegans*. Z. Vergl. Physiol. 15, 672-678 (1931b).
- MAINX, F.: Untersuchungen über den Einfluß von Außenfaktoren auf die phototaktische Stimmung. Arch. Protistenk. 68, 105-176 (1929).
- und H.WOLF: Reaktionsintensität und Stimmungsänderung in ihrer Bedeutung für eine Theorie der Phototaxis. Arch. Protistenk. 93, 105-120 (1940).
- MARBACH, I., and A.M.MAYER: Direction of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* and its relation to cell metabolism. Phycologia 9, 255-260 (1970).
- MAST, S.O.: The relation between spectral color and stimulation in the lower organisms. J. Exp. Zool. 22, 471-528 (1917).
- Reversal in photic orientation in *Volvox* and the nature of photic stimulation. Z. Vergl. Physiol. 5, 730-738 (1927).
 - and P.L.JOHNSON: Orientation in light from two sources and its bearing on the function of the eyespot. Z. Vergl. Physiol. 16, 252-274 (1932).
- MAYER, A.M., and A.POLJAKOFF-MAYBER: The phototactic behaviour of *Chlamydomonas snowiae*. Physiol. Plant. 12, 8-14 (1959).

- NULTSCH, W.: Der Einfluß des Lichtes auf die Bewegung phototropher Mikroorganismen. I. Photokinesis. Abh. Marb. Gel. Ges. Jahrg. 1972, 2. Fink, München (1974).
- G. THROM und I. von RIMSCHA: Phototaktische Untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardtii* in homokontinuierlicher Kultur. Arch. Mikrobiol. 80, 351-369 (1971).
- PICKETT-HEAPS, J.D.: Some ultrastructural features of *Volvox*, with particular reference to the phenomenon of inversion. Planta 90, 174-190 (1970).
- PRINGSHEIM, E.G.: Chlorophyllarme Algen. I. *Chlamydomonas pallens* nov. spec. Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen VIII. Arch. Mikrobiol. 45, 136-144 (1963).
- RINGO, D.L.: Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. J. Cell Biol. 33, 543-571 (1967).
- SCHLETZ, K.: Einfluß der relativen Konzentration von Nitrat und Ammonium auf die Entwicklung des pH-Wertes in einigen Nährmedien für *Volvox aureus*. Z. Pflanzenphysiol. 73, 167-171 (1974).
- SONG, P.S.; and T.A. MOORE: On the photoreceptor pigment for phototropism and phototaxis: Is a carotenoid the most likely candidate? Photochem. Photobiol. 19, 435-441 (1974).
- STAVIS, L.R.: The effect of acids on phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1824-1827 (1974).
- STAVIS, L.R., and R. HIRSCHBERG: Phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol. 59, 367-377 (1973).
- STIEVE, H.: Mechanismen der Erregung von Lichtsinneszellen. Naturw. Rdsch. 27, 45-56 (1974).
- STROTHER, G.K., and J.J. WOLKEN: Microspectrophotometry of *Euglena* chloroplast and eyespot. Nature 188, 601-602 (1960).
- - In vivo absorption spectra of *Euglena*: Chloroplast and eyespot. J. Protozool. 8, 261 - 265 (1961).
- TOLLIN, G., and M.I. ROBINSON: Phototaxis in *Euglena*. V. Photo-suppression of phototactic activity by blue light. Photochem. Photobiol. 9, 411-416 (1969).
- WOLKEN, J.J., and E. SHIN: Photomotion in *Euglena gracilis*. I. Photokinesis, II. Phototaxis. J. Protozool. 2, 39-47 (1958).

Herrn Prof. Dr. W. Haupt danke ich sehr für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für zahlreiche wertvolle Diskussionen.

Herrn cand. rer. nat. H. Kümmel schulde ich Dank für seine große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Pigmentanalyse.

Die Firma Leitz (Wetzlar) und Herr Dipl. Phys. B. Pfeiffer ermöglichten mir in dankenswerter Weise die Durchführung der Mikrospektrophotometrie.

Lebenslauf

20. 6. 1945: Geboren in Hohenberg an der Eger als Sohn der Eheleute Max und Emilie Schletz, geb. Röder.

1951-1956: Besuch der Volksschule in Hohenberg.

1956-1965: Besuch der Oberrealschule in Selb.

20. 7. 1965: Reifezeugnis

Oktober 1965 - März 1967: Wehrdienst in Ebern, München und Regensburg. Entlassung als Fhj. d. R.

Sommersemester 1967 - Wintersemester 1971: Studium der Biologie und Chemie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Frühjahr 1972: Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an den Gymnasien.

Frühjahr 1975: Promotion im Fach Botanik.

Copie - Center 2000

852 ERLANGEN • Obere Karlstr. 30